Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität
Erlangen-Nürnberg Direktor: Prof. Dr. Dr. F. May

Die Umsetzung von 2-Desoxy-D-galaktose im Stoffwechsel

Eine einfache Methode zum Nachweis des Leloir-Weges

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von

Gerhard Weidemann

Berlin

1964

D 29

1964 № 65

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Dekan: Prof. Dr. G. Theissing

Referent: Prof. Dr. Dr. F. May

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 3. 1964

Sonderdruck
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 336, S. 189—191, 1964
Walter de Gruyter & Co., Berlin

Dünnschichtchromatographische Identifizierung von 2-Desoxyzuckern

Von

Gerhard Weidemann* und **Werner Fischer**

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen/Nürnberg

(Der Schriftleitung zugegangen am 2. August 1963)

Für Untersuchungen über das Schicksal von 2-Desoxy-D-galaktose im Stoffwechsel benötigten wir eine Methode zur Identifizierung kleinster Mengen von 2-Desoxyzuckern und entwickelten zu diesem Zweck ein dünnschichtchromatographisches Verfahren.

Als Trennschicht verwendeten wir mit gutem Erfolg mit Natriumacetat gepuffertes Kieselgel G; Kieselgel galt bisher für die Trennung von Zuckern als ungeeignet[1] und wurde auf diesem Gebiet nur in Zusammenhang mit Borsäure verwendet[2]. Als Fließmittel bewährte sich das von Stahl und Kaltenbach[1] angegebene Gemisch Äthylacetat/Propanol-(2)/Wasser 65:23:12. Wie die Abbildung zeigt, läßt sich bei aufsteigender Chromatographie in gesättigter Kammer innerhalb von 60 Min. eine gute Trennung von 2-Desoxy-galaktose, 2-Desoxy-glucose und 2-Desoxy-ribose erzielen.

In der Chinaldin-Reaktion[3] fanden wir einen spezifischen Nachweis, der die bei den bisherigen papierchromatographischen Nachweisen geltende Grenze[4] von 2—5 γ um zwei Zehnerpotenzen unterschreitet und damit die für Dünnschichtverfahren erforderliche Empfindlichkeit besitzt. Die Chinaldin-Reaktion von α-Methylenaldehyden mit 3.5-Diamino-benzoesäure, die sich durch eine intensive Fluoreszenz im UV-Licht auszeichnet, wurde bisher nur für quantitative Bestimmungen in wäßriger Lösung verwendet[5, 6, 7].

Nach Erhitzen der mit dem Diaminobenzoesäure-Reagenz besprühten Platten zeigen 2-Desoxyzucker unter der UV-Lampe eine grüngelbe Fluoreszenz. Es gelingt damit auf dem entwickelten Chromatogramm (Abbildung) 2-Desoxy-glucose und 2-Desoxy-galaktose in Mengen

* D 29.

[1] E. Stahl u. U. Kaltenbach, J. Chromatogr. [Amsterdam] **5**, 351 [1961].

[2] G. Pastuska, Z. analyt. Chem. **179**, 427 [1961].

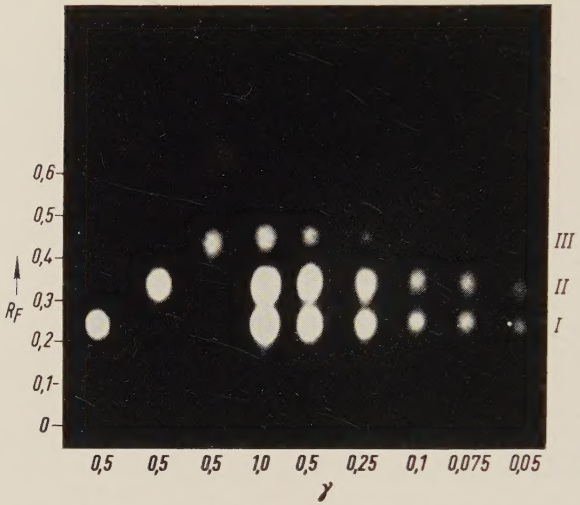
[3] M. M. L. Velluz, M. Pesez u. G. Amiard, Bull. Soc. chim. France **1948**, 680.

[4] Z. Kowalewski, O. Schindler u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta **43**, 1214 [1960]; T. Reichstein u. E. Weiß, Advances Carbohydrate Chem. **17**, 84 [1962].

[5] M. M. L. Velluz, M. Pesez u. M. Herbain, Bull. Soc. chim. France **1948**, 681.

[6] F. B. Cramer u. G. A. Neville, J. Franklin Inst. **256**, 1531 [1953].

[7] M. Blecher, Analytic. Chem. **2**, 30 [1961].



Trennung und Nachweisgrenze von 2-Desoxyzuckern auf Kieselgel G. Im Start wurde jeweils 1 mm³ einer entsprechenden Verdünnungsreihe aufgetragen, Angaben in γ pro Einzelzucker. I: 2-Desoxy-galaktose, II: 2-Desoxy-glucose, III: 2-Desoxy-ribose.

von weniger als 0,05 γ nachzuweisen, während die untere Erfassungsgrenze für 2-Desoxy-ribose mit 0,075—0,1 γ etwas höher liegt. Die Empfindlichkeit gegenüber der Pentose läßt sich, falls erforderlich, durch Verringerung des Säureanteiles im Reagenz erhöhen, geht dann aber für die 2-Desoxyhexosen zurück.

Die grüngelbe Fluoreszenz ist für 2-Desoxyzucker spezifisch. Aldohexosen, Aldopentosen, Methylpentosen, Ketosen, Hexosamine und Alduronsäuren erscheinen im UV-Licht in allen möglichen anderen Farben, jedoch sind hierzu rund 100mal größere Mengen notwendig als für die 2-Desoxyzucker; Zuckeralkohole bleiben auch in hoher Konzentration unsichtbar. In Mengen von über 2 γ zeigen die 2-Desoxyzucker bereits bei normalem Licht eine Braunfärbung. Sie kann zur Identifizierung nicht herangezogen werden, da sie mit Ausnahme der Zuckeralkohole in wenig ausgeprägten Nuancen auch von den oben genannten normalen Zuckern und Zuckerderivaten in Mengen von etwa 10 γ hervorgerufen wird.

Das von uns für 2-Desoxyzucker entwickelte Identifizierungsverfahren dürfte sich auch für den Nachweis der in pflanzlichen Heterosiden vorkommenden 2.6-Didesoxyhexosen eignen. Leider standen uns derartige Verbindungen nicht zur Verfügung.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß sich die Zuordnung der chromatographisch nachgewiesenen 2-Desoxy-glucose zur D-Reihe leicht dadurch erzielen läßt, daß man die zu untersuchende Lösung vor der Chro-

matographie mit Glucose-Oxydase* inkubiert, woraufhin der entsprechende Fleck auf dem Chromatogramm nicht mehr nachweisbar ist.

Beschreibung der Versuche

Zur Beschichtung der Platten (200 × 200 mm) wurden 30 g Kieselgel G (Merck) mit 60 cm³ einer wäßr. 0,02*m* Natriumacetat-Lösung angerührt und in der üblichen Weise aufgetragen. Die Platten wurden danach 30 Min. bei 105° erhitzt. Das Steigmittel Essigsäure-äthylester (zur Chromatographie)/Propanol-(2) (p. a.)/ Wasser 65:23:12 wurde täglich frisch hergestellt. Die Laufstrecke betrug stets 115 mm.

Für die Chinaldin-Reaktion wurde 1 g 3.5-Diamino-benzoesäure-dihydrochlorid** in 25 cm³ 80proz. Phosphorsäure und 60 cm³ Wasser gelöst[6]. Die mit dem Reagenz besprühten Platten (etwa 1,5 cm³ Reagenz auf 100 cm²) wurden etwa 15 Min. im Trockenschrank bei 100° erhitzt. Zur Erzeugung der Fluoreszenz ist sowohl lang- als auch kurzwelliges UV-Licht geeignet (Analysen-Lampen für Untersuchungen bei einer Wellenlänge von 366 bzw. 254 mμ).

Die fluoreszierenden Flecken können im schrägen Auflicht einer UV-Lampe unter Zwischenschaltung des Schottschen Glasfilters GG 14 photographisch aufgenommen werden. Als Lichtquelle benutzten wir die Analysen-Lampe NN 15/44 der Quarzlampen-Gesellschaft Hanau; als Filmmaterial diente Adox-Doku-Pan. Bei einem mittleren Abstand Lichtquelle-Objekt von 20—30 cm und Blende 4 beträgt die Belichtungszeit etwa 7 Min.

Zusammenfassung

Für die Identifizierung von 2-Desoxyzuckern wird eine dünnschichtchromatographische Methode auf mit Natriumacetat gepuffertem Kieselgel beschrieben. Durch Chinaldin-Reaktion mit 3.5-Diamino-benzoesäure werden die 2-Desoxyzucker spezifisch als im UV-Licht grüngelb fluoreszierende Flecken sichtbar gemacht. Es gelingt auf diese Weise, Desoxyhexosen in Mengen unter 0,05 γ zu erfassen.

Summary

2-Deoxy-sugars were separated by thin layer chromatography on kieselgel buffered with sodium acetate. The 2-deoxy-sugars were located by the quinaldine reaction with 3:5-diaminobenzoic acid yielding specifically green-yellow fluorescent spots under UV-illumination. Less than 0.05 μg. of deoxy-hexoses could be detected.

Dr. W. Fischer, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 852 Erlangen, Wasserturmstraße 3.

---

* EC 1.1.3.4.

** Käufliche 3.5-Diamino-benzoesäure (Fluka) wird vor Gebrauch gereinigt: Man versetzt 2 g der Substanz mit etwa 20 cm³ rauchender Salzsäure. Das durch Abzentrifugieren gewonnene Dihydrochlorid wird in möglichst wenig Wasser gelöst und durch Schütteln mit Darco G 60 von gefärbten Begleitstoffen befreit. Nach Entfernen der Kohle wird 3.5-Diamino-benzoesäure-dihydrochlorid mit rauchender Salzsäure gefällt und im Vak. bei 40° getrocknet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538102_0087

Sonderdruck
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 336, S. 192–194, 1964

Zum papierchromatographischen Nachweis von 2-Desoxyzuckern

Von

Gerhard Weidemann und Werner Fischer

Walter de Gruyter & Co., Berlin

Zum papierchromatographischen Nachweis von 2-Desoxyzuckern

Von

Gerhard Weidemann* und **Werner Fischer**

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen/Nürnberg

(Der Schriftleitung zugegangen am 2. August 1963)

Bei der Lokalisation von 2-Desoxyhexosephosphaten auf dem Papier mit dem Perchlorsäure-Molybdat-Reagenz nach Burrows[1] machten wir die Beobachtung, daß der für den Phosphatanteil charakteristischen Blaufärbung eine Braunfärbung vorausgeht. Diese Reaktion zeigten auch die auf dem Chromatogramm vorhandenen freien 2-Desoxyhexosen, bei denen die Braunfärbung bestehen blieb. Die nähere Untersuchung ergab, daß diese Anfärbung allein durch den Säureanteil des Reagenz zustande kommt und sich zum spezifischen Nachweis von 2-Desoxyzuckern eignet.

Am brauchbarsten fanden wir hierzu ein Gemisch aus 1,5 cm^3 60proz. Perchlorsäure p. a. ($d = 1{,}54$) und 20 cm^3 Aceton, in das die trockenen Papierstreifen kurz eingetaucht werden. Anschließend erhitzt man die so behandelten Streifen 2—3 Min. bei 90°, so daß eben noch eine Bräunung des Untergrundes vermieden wird. Dabei erscheinen 2-Desoxy-galaktose, 2-Desoxy-glucose und 2-Desoxy-ribose als tiefbraune Flecken. Abb. 1 vermittelt einen Überblick über die Spezifität der Reaktion: Aldohexosen, Aldopentosen, Methylpentosen, Zuckeralkohole, Alduronsäuren und Hexosamine bleiben in Mengen von 10 γ** unsichtbar; Aldosen geben auch bei 200 γ keine Reaktion, während Methylpentosen von etwa 50 γ aufwärts ockergelb erscheinen. Lediglich 2-Ketosen färben sich bis zu 5 γ herab an, können aber an ihrer Graufärbung leicht von den 2-Desoxyzuckern unterschieden werden.

Die untere Erfassungsgrenze liegt, unmittelbar am aufgetragenen Fleck bestimmt, für 2-Desoxy-glucose und 2-Desoxy-galaktose unter 0,5 γ, für 2-Desoxy-ribose bei etwa 1 γ (Abb. 2). Durch Verringerung des Säureanteiles im Reagenz läßt sich die Empfindlichkeit für 2-Desoxyribose erhöhen, geht dann aber für die 2-Desoxyhexosen zurück.

Mit dem Perchlorsäure-Aceton-Reagenz kann neben freien 2-Desoxyaldosen auch der Zuckeranteil in 2-Desoxy-glucose-6-phosphat, 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat und Uridindiphosphat-2-Desoxyhexosen

---

* D 29.

** Die Zuckermenge wurde jeweils in 1 mm^3 wäßr. Lösung durch einmaliges Auftragen auf das Papier gebracht.

[1] S. Burrows, F. S. M. Grylls u. J. S. Harrison, Nature [London] **170**, 800 [1952].

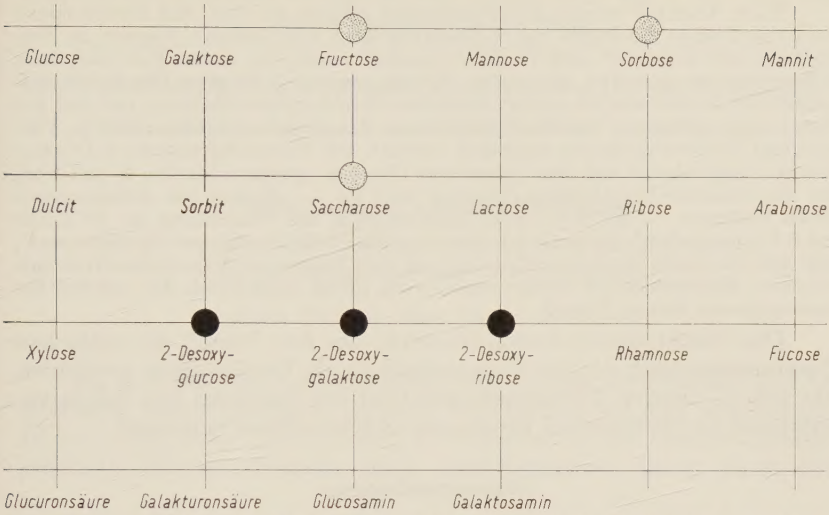


Abb. 1. Zur Spezifität des Nachweises von 2-Desoxyzuckern mit dem Perchlorsäure-Aceton-Reagenz. Von allen geprüften Substanzen wurden jeweils 10 γ (1 mm³) aufgetragen. 2-Desoxyzucker: dunkelbraun, 2-Ketosen: grau.

sichtbar gemacht werden[2]; die Braunfärbung wird durch den Phosphatanteil dieser Verbindungen nicht verändert.

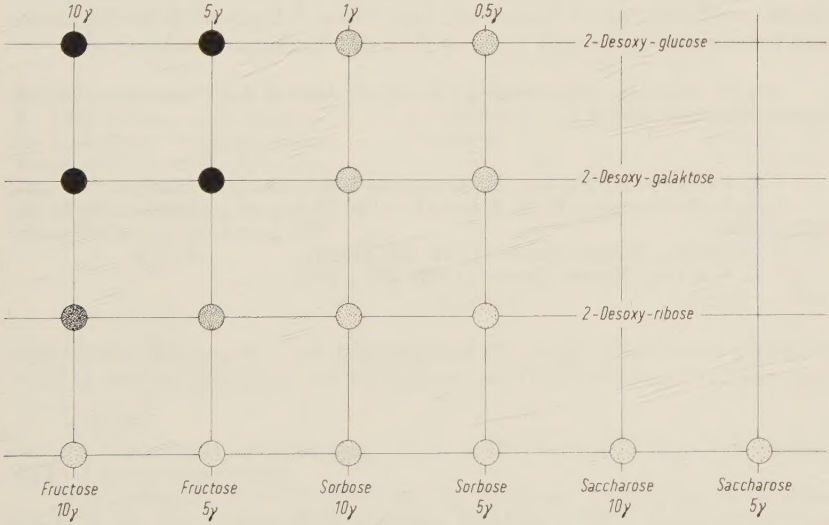


Abb. 2. Nachweisgrenze von 2-Desoxyzuckern und Ketosen mit dem Perchlorsäure-Aceton-Reagenz.

[2] W. Fischer u. G. Weidemann, diese Z. **336**, 189 [1964], vorstehend.

Nach Abschluß unserer Untersuchungen stellten wir fest, daß Perchlorsäure zum spezifischen Nachweis von 2-Desoxyzuckern von anderen Autoren in Verbindung mit Borsäure[3] oder Vanillin[4] benutzt wurde. Im ersten Fall erscheinen 2-Desoxyzucker graublau, im zweiten Fall als purpurrote Flecken. Der Spezifitätsbereich ist ähnlich wie bei unserer einfachen Perchlorsäure-Reaktion, nur daß mit dem kupplungsfähigen Vanillin-Perchlorsäure-Reagenz auch Zuckeralkohole, Phenole und Indolverbindungen angefärbt werden[5]. Die Nachweisgrenze für 2-Desoxyhexosen liegt hierbei auf dem gelaufenen Chromatogramm zwischen 2 und 5 γ[4], für das Borsäure-Perchlorsäure-Reagenz wird sie — offenbar am aufgetragenen Fleck bestimmt — mit 2 γ, unter Heranziehung der Fluoreszenz im UV-Licht mit 0,5 γ angegeben[3]. Auch das kürzlich eingeführte Thiobarbiturat-Sprühreagenz[6], mit dem der durch Perjodat-Oxydation auf dem Papier aus 2-Desoxyzuckern entstandene Malondialdehyd nachgewiesen wird, bietet hinsichtlich der unteren Erfassungsgrenze keinen Vorteil.

Das Perchlorsäure-Aceton-Gemisch, das den Vorteil der einfachen Zusammensetzung mit der Verwendbarkeit als Tauchreagenz verbindet, hat sich in unseren Untersuchungen über das Schicksal von 2-Desoxygalaktose im Stoffwechsel bereits als sehr brauchbar erwiesen[2].

Zusammenfassung

Der spezifische Nachweis von 2-Desoxyzuckern auf dem Papier mit Perchlorsäure-Aceton wird beschrieben. Die untere Erfassungsgrenze liegt für 2-Desoxy-glucose und -galaktose unter 0,5 γ, für 2-Desoxyribose bei 1 γ.

Summary

The specific identification of 2-deoxy-sugars on paper with perchloric acid-acetone is described. Less than 0.5 μg. of 2-deoxyglucose and 2-deoxygalactose and 1 μg. of 2-deoxyribose can be detected.

Dr. W. Fischer, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 852 Erlangen, Wasserturmstraße 3.

---

[3] M. Pöhm u. R. Weiser, Naturwissenschaften **43**, 582 [1956].
[4] A. P. McLennan, H. M. Randall u. D. W. Smith, Analytic. Chem. **31**, 2020 [1959].
[5] P. Godin, Nature [London] **174**, 134 [1954].
[6] L. Warren, Nature [London] **186**, 237 [1960].

Sonderdruck
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 336, S. 195—205, 1964
Walter de Gruyter & Co., Berlin

Die Umsetzung von 2-Desoxy-D-galaktose im Stoffwechsel, I

Eine einfache Methode zum Nachweis des Leloir-Weges

Von

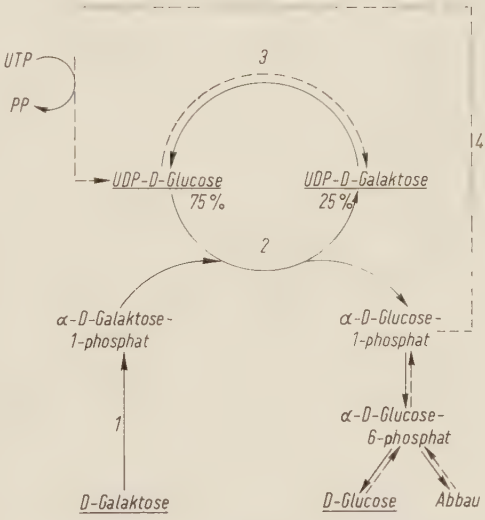
Werner Fischer und **Gerhard Weidemann***

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen/Nürnberg

(Der Schriftleitung zugegangen am 2. August 1963)

Herrn Professor May zum 65. Geburtstag

Im menschlichen und tierischen Organismus, in Pflanzen und bestimmten Mikroorganismen gelangt D-Galaktose auf dem sogenannten Leloir-Weg unter Umwandlung in D-Glucose in den Intermediärstoffwechsel[1]. Wie das Schema zeigt, wird Galaktose hierzu durch eine



Schema zum Stoffwechsel der D-Galaktose auf dem Leloir-Weg.
←—— Umwandlung und Abbau über D-Glucose.
←- - - Biosynthese der D-Galaktose.
1. Galaktokinase, EC 2.7.1.6; 2. UDP-Glucose:α-D-Galaktose-1-phosphat-Uridylyl-transferase, EC 2.7.7.12; 3. UDP-Glucose-4-Epimerase, EC 5.1.3.2; 4. UTP:α-D-Glucose-1-phosphat-Uridylyl-transferase, EC 2.7.7.9.

spezifische Kinase an C-1 phosphoryliert[2]. Auf Galaktose-1-phosphat wird in zweiter Reaktion der Uridylrest aus UDP-Glucose** übertragen,

* D 29.

** Verwendete Abkürzungen: UDP, UTP: Uridindi- bzw. -triphosphat; ATP: Adenosintriphosphat.

[1] L. F. Leloir in W. D. McElroy u. B. Glass, Phosphorus Metabolism, Bd. I, S. 67, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1951; H. M. Kalckar u. H. de Robichon Szulmajster, Bull. Soc. Chim. biol. **41**, 1309 [1959]; W. Z. Hassid, E. F. Neufeld u. D. S. Feingold, Proc. nat. Acad. Sci. USA **45**, 905 [1959].

[2] R. E. Trucco, R. Caputto, L. F. Leloir u. N. Mittelman, Arch. Biochemistry **18**, 137 [1948].

wodurch UDP-Galaktose und Glucose-1-phosphat entstehen[3, 4]. Während Glucose-1-phosphat durch die Phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1) umgesetzt wird, erfährt UDP-Galaktose durch Wendung der Hydroxylgruppe an C-4 eine Umwandlung zu UDP-Glucose, die damit erneut für Reaktion 2 zur Verfügung steht[3]. Eine Modifikation des Leloir-Weges wurde kürzlich für *Streptococcus faecalis* beschrieben[5]; die Umwandlung von Galaktose in Glucose erfolgt hier nicht an Uridin-, sondern an Thymidindiphosphat. Die Vergesellschaftung von Guanosindiphosphatglucose und Guanosindiphosphat-galaktose in Milchen[6] macht schließlich eine Epimerisierung der beiden Zucker auch an diesem Nucleotid wahrscheinlich.

Eine einfache Methode zum Nachweis des Leloir-Weges und seiner Modifikationen steht derzeit nicht zur Verfügung. Der Nachweis der Einzelfermente ist aufwendig und Untersuchungen mit Hilfe von [^{14}C]-Galaktose bleiben auf Speziallaboratorien beschränkt. Ausgehend von der Tatsache, daß 2-Desoxy-D-galaktose durch die Galaktokinase aus *Saccharomyces fragilis* phosphoryliert wird[7] und natürliche Vorkommen von 2-Desoxyhexosen äußerst selten sind — bisher wurden nur 2-Desoxy-D-glucose und 2-Desoxy-(D)-gulose als Bestandteile herzwirksamer Glykoside gefunden[8] — versuchten wir einen Nachweis des Leloir-Weges mit Hilfe von 2-Desoxy-D-galaktose. Wir benutzten dabei die Desoxygruppe gewissermaßen als Markierung, wofür sich diese deshalb noch besonders eignet, weil freie und gebundene 2-Desoxyzucker durch spezifische Anfärbeverfahren auf Chromatogrammen einfach und sicher identifiziert werden können[9, 10]. Gegenüber Versuchen mit D-Galaktose stand als weiterer Vorteil eine Anhäufung der phosphorylierten Zwischenprodukte in der Zelle zu erwarten, da das als Endprodukt der Umsetzung zu vermutende 2-Desoxy-D-glucose-6-phosphat (Schema) nach Untersuchungen an tierischen Zellen[11] und Kulturhefen[12] keinen Abbau im Stoffwechsel erfährt.

Wir verwendeten für unsere Versuche untergärige Bierhefe, da *Saccharomyces*-Arten D-Galaktose ausschließlich auf dem Leloir-Weg umsetzen und zudem die hierfür erforderlichen Fermente erst nach Ver-

---

[3] L. F. Leloir, Arch. Biochem. Biophysics **33**, 186 [1951].

[4] H. M. Kalckar, B. Braganca u. A. Munch-Petersen, Nature [London] **172**, 1038 [1953].

[5] J. H. Pazur, K. Klepper u. A. Cepure, Biochem. biophysic. Res. Commun. **7**, 157 [1962].

[6] R. Denamur, G. Faucenneau u. G. Jarrize-Guntz, Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys. **1**, 74 [1961].

[7] F. Alvarado, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **41**, 233 [1960].

[8] Z. Kowalewski, O. Schindler, H. Jäger u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta **43**, 1280 [1960].

[9] G. Weidemann u. W. Fischer, diese Z. **336**, 189 [1964].

[10] G. Weidemann u. W. Fischer, diese Z. **336**, 192 [1964], vorstehend.

[11] A. N. Wick, D. R. Drury, H. I. Nakada u. J. B. Wolfe, J. biol. Chemistry **224**, 963 [1957]; D. M. Kipnis u. C. F. Cori, ebenda **234**, 171 [1959].

[12] L. Kiesow, Z. Naturforsch. **14b**, 492 [1959].

fütterung von Galaktose bilden[13]. Um Anhaltspunkte für die Umsetzung des Desoxyzuckers durch die Fermente des Galaktosestoffwechsels zu gewinnen, untersuchten wir zunächst, ob Beziehungen zwischen der Aufnahme und Phosphorylierung der 2-Desoxy-galaktose und der Adaptation der Hefe an Galaktose bestehen. Für den Nachweis einer Umwandlung der Galaktosekonfiguration in die Glucosekonfiguration machten wir uns die Beobachtung zunutze, daß 2-Desoxy-glucose-6-phosphat in Kulturhefen unter bestimmten Bedingungen dephosphoryliert und der freigesetzte Zucker wieder an das Medium abgegeben wird[12, 14], und prüften auf diese Weise die Umwandlungsmöglichkeit auf dem Leloir-Weg an der Summenreaktion:

2-Desoxy-D-galaktose ⟶ 2-Desoxy-D-glucose

Über die Charakterisierung der im Zellinhalt nachweisbaren phosphorylierten Zwischenverbindungen wird in der II. Mitteilung[15] berichtet.

Materialien und Methoden

Substanzen: 2-Desoxy-D-galaktose und 2-Desoxy-D-glucose wurde von Nutritional Biochemical Corporation, 2-Desoxy-D-glucose-6-phosphat (Natriumsalz) von Sigma Chemical Corporation, Glucose-Oxydase (EC 1.1.3.4) und die Glucose-Oxydase-Testkombination von der Fa. Boehringer bezogen. Die verwendete 2-Desoxy-galaktose erwies sich bei Dünnschicht-Chromatographie und Prüfung mit Glucose-Oxydase frei von 2-Desoxy-glucose.

Hefe: Alle Versuche wurden mit untergäriger Bierhefe der Grüner Bräu AG (Fürth/Bayern) durchgeführt. Die Hefe wurde stets frisch bezogen und, falls erforderlich, im wesentlichen nach Nilsson[16] an Galaktose adaptiert. Da die zur Adaptation verabfolgte Galaktose zunächst für die Synthese der Leloir-Fermente nicht genutzt werden kann, setzten wir zur Beschleunigung der Fermentbildung am 1. und 2. Tag 10 und 5 g Glucose zu und fütterten außerdem als Stickstoffquelle täglich 1 g Ammoniumsulfat. Nach 4 Tagen wurde die Fütterung mit Galaktose ausgesetzt und die Hefe einen Tag später in den Versuch genommen.

Quantitative Bestimmungen: 2-Desoxy-glucose und 2-Desoxy-galaktose wurden sowohl einzeln als auch im Gemisch nach der Stollschen Methode[12] bestimmt: 2 cm³ der zu untersuchenden Lösung werden im Eisbad mit 2 cm³ rauchender Salzsäure (d = 1,19) versetzt, gut durchmischt, in verschlossenen Reagenzgläsern genau 3 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und sofort im Eisbad abgekühlt; 10 Min. später liest man die Extinktion bei 366 mμ ab. Wie Abb. 1 zeigt, ist die Extinktion der Desoxyhexosen-Konzentration proportional und gibt für 2-Desoxy-galaktose und 2-Desoxy-glucose praktisch die gleichen Werte.

Die quantitative Bestimmung von 2-Desoxy-glucose erfolgte mit der Glucose-Oxydase-Testkombination. Um niedrige Konzentrationen der langsam reagierenden 2-Desoxy-glucose messen zu können, wurde 1 cm³ der zu untersuchenden Lösung mit 4 cm³ Reagenz 75 Min. im Wasserbad bei 35° inkubiert und anschließend wie üblich die Extinktion bei 436 mμ abgelesen.

---

[13] H. de Robichon Szulmajster, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **29**, 270 [1958].

[14] L. Kiesow u. S. Döge, Z. Naturforsch. **16b**, 576 [1961].

[15] II. Mitteil.: W. Fischer u. G. Weidemann, diese Z. **336**, 206 [1964], nachstehend.

[16] R. Nilsson in E. Bamann u. K. Myrbäck, Methoden der Fermentforschung, Bd. 2, S. 1294, Georg Thieme, Leipzig 1941.

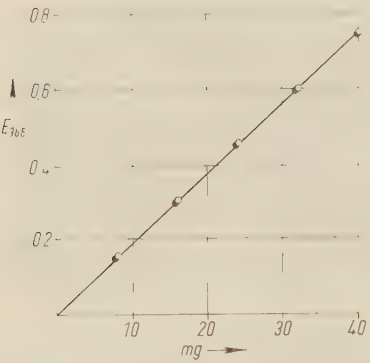


Abb. 1. Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von 2-Desoxy-galaktose (●) und 2-Desoxy-glucose (○) mit der Stollschen Methode. Abszisse: mg Desoxyhexosen je 100 cm³ Untersuchungslösung.

Im geprüften Konzentrationsbereich (0—48 γ 2-Desoxy-glucose 5-cm³-Ansatz) folgt die Farbentwicklung dem Lambert-Beerschen Gesetz. Zugesetzte 2-Desoxy-galaktose ist auch in hoher Konzentration ohne Einfluß auf das Meßergebnis.

Chromatographische Methoden: Die Identifizierung der 2-Desoxyhexosen erfolgte dünnschichtchromatographisch auf einer gepufferten Kieselgelschicht; sie wurden durch die Chinaldin-Reaktion mit 3.5-Diamino-benzoesäure sichtbar gemacht[9]. Desoxyhexosephosphate wurden auf mit Salzsäure gewaschenem Papier (Schleicher & Schüll 2043b) mit n-Propanol 33proz. Ammoniak Wasser 6:3:1 absteigend chromatographiert[17] und der Zuckeranteil durch Braunfärbung mit dem von uns mitgeteilten Perchlorsäure-Aceton-Gemisch[10] sichtbar gemacht; zum Nachweis des Phosphatanteiles verwendeten wir das Perchlorsäure-Molybdat-Reagenz nach Burrows[18].

Inkubation der Hefe mit 2-Desoxy-galaktose: Pro Ansatz wurden 18 g abgesaugte Hefe in 90 cm³ einer Lösung aus 60 mg Desoxygalaktose in 100 cm³ 0,05*m* KH_2PO_4 suspendiert. Die Aufschwemmung wurde je nach Bedarf mit O_2 oder N_2 durchgast und unter wiederholtem Schütteln bei konstanter Temperatur gehalten.

Zur Messung von Aufnahme und Abgabe des Desoxyzuckers durch die Zellen wurden in bestimmten Zeitabständen je 5 cm³ entnommen, die Zellen sofort abzentrifugiert und im Überstand die Konzentration des Desoxyzuckers bestimmt. Als Leerwert führten wir stets denselben Ansatz ohne Desoxygalaktose mit.

Zur Ermittlung des im Ansatz vorhandenen Volumens an Hefezellen wurden 200 mm³ der Suspension in einer Kapillare bei 1500 U./Min. bis zur Konstanz der sedimentierenden Zellsäule zentrifugiert, die Höhe der Zellsäule mit dem Meßmikroskop abgelesen und das ihr entsprechende Zellvolumen aus einer Eichkurve entnommen. Daraus wurde das 100 mm³ Hefezellen entsprechende Volumen an zellfreiem Medium ermittelt, die aus diesem Volumen in der Versuchsdauer verschwundene Zuckermenge berechnet und auf diese Weise die aufgenommene Menge an Desoxy-galaktose auf 100 mm³ Hefezellen bezogen.

Untersuchung des Zellinhaltes: Die abzentrifugierten Zellen wurden in 0,05*m* KH_2PO_4-Lösung von 0° gewaschen und durch dreimaliges Ausfrieren in flüssiger Luft aufgeschlossen. Nach dem Auftauen wurden die groben Partikeln bei 0° abzentrifugiert und der auf pH 7 gebrachte Überstand zur Papierchromatographie verwendet. Um gut sichtbare Flecken zu erhalten, wurde der Zellinhalt durch 3- bis 5maliges Auftragen im Start angereichert. Zum Aufschluß der Zellen erwies sich Kochen in Trichloressigsäure oder Kochen in Wasser wegen der Labilität der 2-Desoxy-hexosephosphate[15] als unbrauchbar.

[17] C. S. Hanes u. F. A. Isherwood, Nature [London] **164**, 1107 [1949].
[18] S. Burrows, F. S. M. Grylls u. J. S. Harrison, Nature [London] **170**, 800 [1952].

Ergebnisse

Aufnahme von 2-Desoxy-galaktose durch Hefezellen

Adaptierte und nicht adaptierte Hefe wurde 4 Stdn. in O_2-Atmosphäre mit Desoxy-galaktose inkubiert und die Aufnahme des Zuckers in die Zellen an Hand der Konzentrationsabnahme im Medium verfolgt. Die Versuche wurden bei $+14^0$ durchgeführt, da die Aufnahme bei höherer Temperatur langsamer verläuft (Abb. 2). Die Sauerstoffabhängigkeit des Aufnahmeprozesses läßt vermuten, daß die Beschleunigung durch den bei niedriger Temperatur erhöhten Absorptionskoeffizienten von O_2 verursacht ist. Wie Abb. 3 zeigt, besteht ein erheblicher Unterschied in der Aufnahme der 2-Desoxy-galaktose durch adaptierte und nicht adaptierte Zellen. Die Aufnahme durch adaptierte Hefe verläuft von Anfang an schneller und ist auch nach 4 Stdn. noch nicht beendet. Bei nicht adaptierten Zellen fällt die Aufnahme-Geschwindigkeit bereits nach 15 Min. erheblich ab und noch vor Ablauf 1 Stde. kommt die Nettoaufnahme völlig zum Stillstand. Berechnet man unter der Annahme, daß Hefezellen einen Wassergehalt von 65% haben[19], die intra-

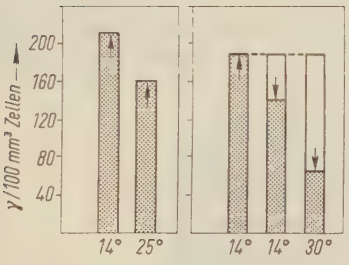


Abb. 2

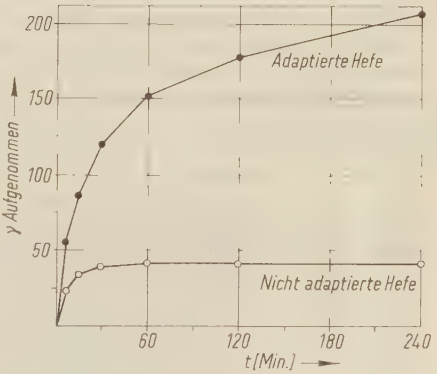


Abb. 3

Abb. 2. Temperaturabhängigkeit der Aufnahme (↑) und der Abgabe (↓) von 2-Desoxy-galaktose durch an Galaktose adaptierte Hefezellen. Die Aufnahme erfolgte in O_2-, die Abgabe in N_2-Atmosphäre; Endwerte nach 4stdg. Inkubation.

Abb. 3. Aufnahme von 2-Desoxy-galaktose durch an Galaktose adaptierte (●) und nicht adaptierte (○) Hefezellen in O_2-Atmosphäre bei $+14^0$. Die von 100 mm³ Hefezellen aufgenommene Zuckermenge wurde durch Messung der Konzentrationsabnahme im Medium und Ermittlung des Hefevolumens im Ansatz bestimmt.

zelluläre Konzentration des Desoxyzuckers nach 4stdg. Versuchsdauer, so findet man diese in adaptierter Hefe rund 5mal höher als in nicht adaptierter. Beim Vergleich mit der gleichzeitig gemessenen Außenkonzentration stellt man außerdem eine 16,1fache Anreicherung der Desoxygalaktose in den adaptierten Zellen fest, während die Konzentration in der nicht adaptierten Hefe nur das 1,2fache der extrazellulären

[19] J. White, Yeast Technology, London 1954, zit. nach M. Burger, Biochem. J. **71**, 233 [1959].

Aufnahme und Anreicherung von 2-Desoxy-galaktose durch adaptierte und nicht adaptierte Hefezellen nach 4stdg. Inkubation bei 14° und Durchgasung mit O_2.

	nicht adaptiert	adaptiert
Aufgenommene Menge [γ/100 mm³ Zellen]	40,9	208,9
Konzentration [mg/100 ml]		
im Medium bei Versuchsbeginn . .	60,5	59,5
im Medium nach 4 Stdn.	52	20
in den Zellen nach 4 Stdn.	63	321,4

Konzentration beträgt (Tabelle). Aufschluß über die Ursache dieses unterschiedlichen Verhaltens gibt die papierchromatographische Untersuchung des Zellinhaltes nach 4stdg. Inkubation (Abb. 4). In der adaptierten Hefe (a) findet man neben geringen Mengen an freiem Desoxyzucker zwei weitere Fraktionen, die beide auf Grund ihrer Reaktion mit dem Perchlorsäure- und Molybdatreagenz als Desoxyhexosephosphate charakterisiert sind, und von denen sich die langsamer wandernde Komponente III an der Absorption im UV-Licht außerdem als Nucleotidverbindung zu erkennen gibt. Die nicht adaptierte Hefe enthält freie Desoxygalaktose in ähnlicher Konzentration wie adaptierte, aber nur sehr wenig Desoxyhexosephosphat und die Nucleotidverbindung scheint völlig zu fehlen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die schnellere Aufnahme und größere Anreicherung der Desoxygalaktose in den adap-

Abb. 4. Papierchromatogramm (n-Propanol/Ammoniak/Wasser 6:3:1, Durchlaufchromatogramm) des Zellinhaltes von a) adaptierter und b) nicht adaptierter Hefe nach 4stdg. Inkubation mit 2-Desoxy-galaktose in O_2-Atmosphäre. Von der nicht adaptierten Hefe wurde die doppelte Menge Zellinhalt aufgetragen wie von der adaptierten. I: Freie Desoxyhexosen, II und III: Desoxyhexosephosphate (III: Nucleotidverbindung).

tierten Zellen durch eine intensivere Phosphorylierung des Zuckers verursacht wird, die ihrerseits durch die adaptative Vermehrung der Leloir-Fermente bedingt ist. Andererseits zeigt die geringgradige Phosphorylierung in nicht adaptierten Zellen, daß diese Spuren von Galakto-

kinase besitzen, und erklärt auch hier die intrazelluläre Akkumulation des Desoxyzuckers gegenüber dem Medium.

Umwandlung in 2-Desoxy-glucose durch intakte Zellen

Für den Nachweis, daß 2-Desoxy-galaktose den ganzen Leloir-Weg durchläuft und eine Umwandlung in 2-Desoxy-glucose erfährt, konnten wir auf Beobachtungen über das Verhalten von 2-Desoxy-glucose in Kulturhefen zurückgreifen[12]. Danach wird der Zucker in Sauerstoffatmosphäre unter Phosphorylierung zu 2-Desoxy-glucose-6-phosphat intrazellulär angereichert; beim Übergang auf anaerobe Bedingungen wird er in freier Form nahezu quantitativ wieder an das Medium abgegeben. Man nimmt zur Erklärung an, daß durch Herabsetzung der ATP-Bildung im Gärungsstoffwechsel die Phosphorylierung des Zuckers verlangsamt wird; dadurch gewinnt die ständig ablaufende Dephosphorylierung des Esters die Oberhand und der freigesetzte Zucker verläßt, dem Konzentrationsgefälle folgend, die Zelle wieder.

Auch in an Galaktose adaptierter Bierhefe findet man nach aerober Inkubation mit 2-Desoxy-glucose oder 2-Desoxy-galaktose beim Übergang in N_2-Atmosphäre einen Ausstrom der Desoxyhexosen ins Medium (Abb. 5). Während aber die mit 2-Desoxy-glucose vorinkubierten Zellen (a_{N_2}) nur diesen Zucker abgeben, erscheint im Versuch mit 2-Desoxy-galaktose (b_{N_2}) neben dieser ein zweiter Desoxyzucker, der sich auf Grund seines chromatographischen Verhaltens und der Oxydierbarkeit durch Glucose-Oxydase (Abb. 6) als 2-Desoxy-D-glucose charakterisieren läßt.

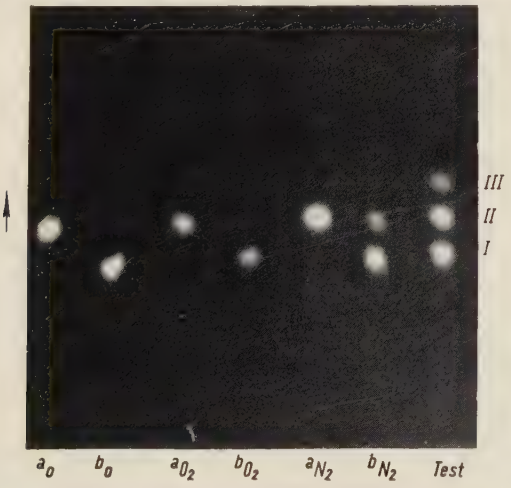


Abb. 5. Aufnahme von 2-Desoxy-D-glucose (a) und 2-Desoxy-D-galaktose (b) durch adaptierte Hefe in Anwesenheit von O_2 und Wiederabgabe der Desoxyhexosen in N_2-Atmosphäre. Dünnschicht-Chromatogramm des zellfreien Inkubationsmediums zu Versuchsbeginn (0), nach 4 Stdn. in O_2 und weiteren 4 Stdn. in N_2. Test: I: 2-Desoxy-galaktose, II: 2-Desoxy-glucose, III: 2-Desoxy-ribose. Fließmittel: Äthylacetat/Propanol-(2)/Wasser 65:23:12.

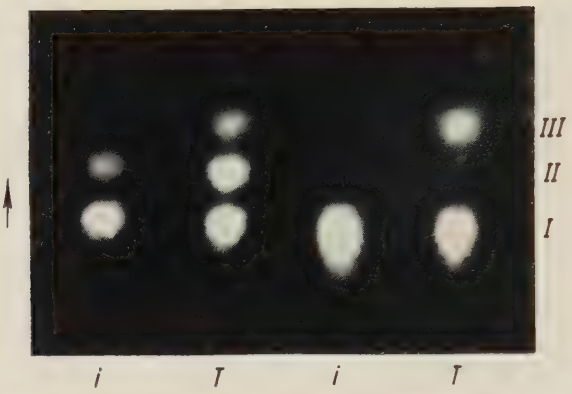


Abb. 6. Identifizierung der in Hefe aus 2-Desoxy-galaktose gebildeten 2-Desoxy-glucose. Links: Inkubationsmedium (*i*) und Testzuckergemisch (*T*) vor, rechts: nach Behandlung mit Glucose-Oxydase. I: 2-Desoxy-galaktose, II: 2-Desoxy-glucose, III: 2-Desoxy-ribose.

Es erwies sich als vorteilhaft, während der Inkubation in N_2-Atmosphäre die Temperatur von 14 auf 30° zu erhöhen, da hierdurch die Abgabe der Desoxyhexosen, wie nach der RGT-Regel zu erwarten, beschleunigt wird (Abb. 2). Abb. 7 gibt den Verlauf eines unter diesen Bedingungen durchgeführten Versuches wieder. Von den ursprünglich im Gesamtansatz vorhandenen 59,5 mg Desoxygalaktose hatte die Hefe in

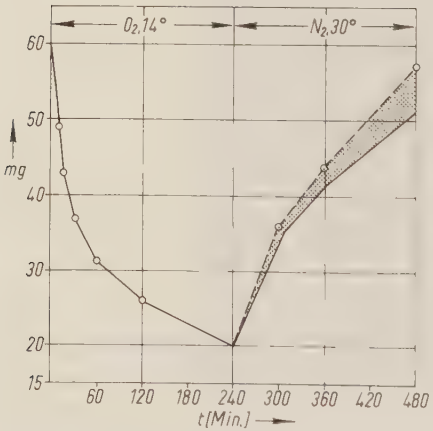


Abb. 7. Aerobe Aufnahme von 2-Desoxy-galaktose und anschließende Abgabe von 2-Desoxy-galaktose und 2-Desoxy-glucose in N_2-Atmosphäre durch an Galaktose adaptierte Hefezellen. Abszisse: mg Desoxyhexosen in 100 m*l* Medium. Gestrichelt: Gesamt-Desoxyhexosen, punktierte Fläche: 2-Desoxy-glucose.

O_2-Atmosphäre 39,2 mg aufgenommen. Innerhalb von weiteren 4 Stdn. wurden in N_2-Atmosphäre 36,9 mg oder 94% der aufgenommenen Menge in Form von Desoxygalaktose und Desoxyglucose wieder an das Medium

abgegeben. Davon entfallen nach Messung mit Glucose-Oxydase* 5,8 mg auf Desoxyglucose, was 16% der in N_2-Atmosphäre freigesetzten „Gesamt-Desoxyhexosen" entspricht. In zwei weiteren Versuchen wurde der Anteil von Desoxyglucose zu 23 und 25% bestimmt.

Der zeitliche Verlauf in Abb. 7 zeigt, daß Desoxyglucose gegenüber Desoxygalaktose etwas verzögert abgegeben wird. Die Ursache dürfte darin liegen, daß 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat zunächst in höherer Konzentration vorliegt als 2-Desoxy-glucose-6-phosphat (vgl. l. c.[15]) und daher durch die Phosphatase anfangs in stärkerem Ausmaß dephosphoryliert wird.

Auch nicht adaptierte Hefe gibt unter Stickstoff etwa 30% der in O_2-Atmosphäre aufgenommenen 2-Desoxy-galaktose ab, ohne daß dabei jedoch 2-Desoxy-glucose nachweisbar würde. Die Umwandlung in 2-Desoxy-glucose zeigt damit wie die Aufnahme und die Phosphorylierung der Desoxygalaktose die bei einer Umsetzung auf dem Leloir-Weg zu erwartende Abhängigkeit von der Adaptation der Hefe an Galaktose.

Umsetzung von 2-Desoxy-galaktose durch Zellfraktionen

Adaptierte Hefezellen wurden zweimal in flüssiger Luft ausgefroren und durch 60 Min. langes Zentrifugieren bei $80000 \times g$ in eine Zellsaft- und Partikelfraktion getrennt. Der Zellsaft und die in 0,05*m* KH_2PO_4 aufgeschwemmte Partikelfraktion wurden ohne Zusatz von ATP mit 2-Desoxy-galaktose (etwa 150 mg/100 m*l* Ansatz) versetzt und bei 20° inkubiert. Wie die Chromatogramme in Abb. 8 und 9 zeigen, nimmt der freie Desoxyzucker in beiden Ansätzen während der ersten 4 Stdn. beträchtlich ab, und es entstehen in Parallele hierzu die aus Abb. 4a bereits bekannten Desoxyhexosephosphat-Fraktionen, wobei erwartungsgemäß (vgl. Schema) die Bildung des einfachen Esters (II in Abb. 9) der Entstehung der Nucleotidverbindung zeitlich vorausgeht. Während die Konzentration an 2-Desoxy-galaktose im Zellsaft in den folgenden 20 Stdn. annähernd konstant bleibt, nimmt sie in der Partikelfraktion erneut zu, wobei von der 9. Stde. an in zunehmendem Maße 2-Desoxyglucose als Umwandlungsprodukt in Erscheinung tritt (Abb. 8).

Die anfängliche Abnahme und spätere Zunahme der freien Desoxyzucker dürfte ihre Ursache darin haben, daß sich die ursprünglich vorhandenen Energiereserven im Lauf der Zeit erschöpfen und dadurch die zu Beginn überwiegende Kinasereaktion allmählich hinter der Phosphatasereaktion zurücktritt. Daß die Dephosphorylierung nur in der Partikelfraktion erfolgt, erklärt sich daraus, daß diese praktisch die gesamte Phosphataseaktivität der Hefezelle enthält[16].

Bei der Inkubation beider Zellfraktionen mit 2-Desoxy-galaktose treten noch zwei weitere Verbindungen auf, die bisher nicht identifiziert

* Glucose, die in das Meßergebnis mit eingegangen wäre, konnte durch Papierchromatographie des 100fach eingeengten Inkubationsmediums ausgeschlossen werden.

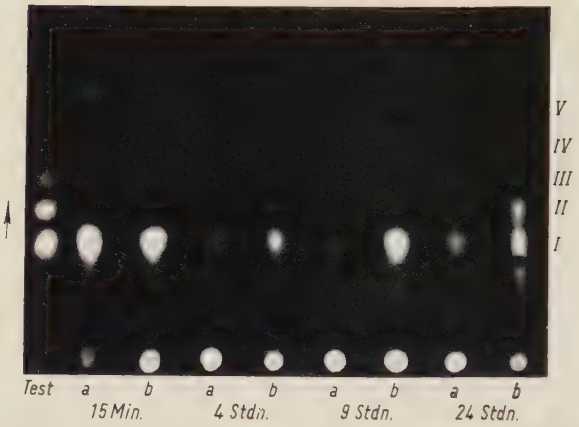


Abb. 8. Umsetzung von 2-Desoxy-galaktose durch Zellsaft (a) und Partikelfraktion (b) aus adaptierten Hefezellen. Dünnschicht-Chromatogramm der freien Desoxyhexosen nach 15 Min., 4, 9, 24 Stdn. Inkubation. I: 2-Desoxy-galaktose, II: 2-Desoxy-glucose, III: 2-Desoxy-ribose, IV und V: nicht identifizierte Verbindungen; die gebildeten Desoxyhexosephosphate bleiben im Start.

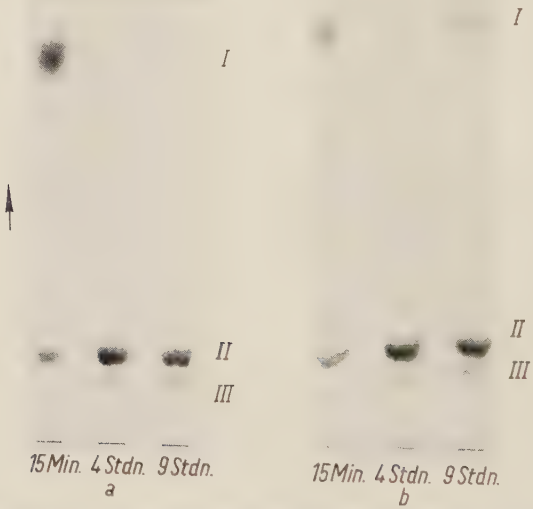


Abb. 9. Umsetzung von 2-Desoxy-galaktose durch Zellsaft (a) und Partikelfraktion (b) aus adaptierten Hefezellen. Papierchromatogramm (n-Propanol/Ammoniak/Wasser, Durchlaufchromatogramm) der freien Desoxyhexosen (I) und Desoxyhexosephosphate (II und III; III: Nucleotidverbindung) nach 15 Min., 4 und 9 Stdn. Inkubation.

wurden (IV und V in Abb. 8). Beide Substanzen wandern auf dem Chromatogramm rascher als die Desoxyzucker, geben aber wie diese mit dem

von uns verwendeten Diaminobenzoesäure-Reagenz[3] eine Fluoreszenz im UV-Licht, die für α-Methylenaldehyde charakteristisch ist.

Die Herkunft dieser beiden Verbindungen aus den Desoxyhexosen wird dadurch wahrscheinlich, daß ihre Konzentration in auffallender Weise derjenigen der freien Desoxyhexosen folgt und daß sie bei Inkubation der Zellfraktionen ohne 2-Desoxy-galaktose nicht nachweisbar sind.

Es kann sich dabei nicht um die Lactone der 2-Desoxy-aldonsäuren handeln, da das bei der Umsetzung von 2-Desoxy-glucose durch Glucose-Oxydase auftretende 2-Desoxy-gluconolacton auf dem Dünnschicht-Chromatogramm von unserem Nachweis-Reagenz nicht erfaßt wird.

Gelegentlich konnten die beiden Verbindungen auch nach Inkubation von intakten Zellen mit Desoxygalaktose im Außenwasser nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Die Umsetzbarkeit von 2-Desoxy-galaktose auf dem Leloir-Weg wurde an untergäriger Bierhefe gezeigt: Nach Adaptation der Hefe an D-Galaktose findet man unter aeroben Bedingungen eine beschleunigte Aufnahme der Desoxyhexose und eine beträchtliche intrazelluläre Anreicherung von Desoxyhexose-phosphatestern. Beim Übergang auf anaerobe Bedingungen wird durch Überwiegen der Dephosphorylierungsvorgänge die aus 2-Desoxy-galaktose entstandene 2-Desoxy-glucose freigesetzt und an das Inkubationsmedium abgegeben. In nicht adaptierter Hefe findet nur eine geringgradige Phosphorylierung, aber keine faßbare Umwandlung in 2-Desoxy-glucose statt.

Die beiden Desoxyhexosen erfahren in den Hefezellen keinen Abbau, so daß die entstandene 2-Desoxy-glucose leicht nachgewiesen werden kann. 2-Desoxy-galaktose eignet sich somit als Markierungssubstanz zum einfachen Nachweis des Leloir-Weges. Die Brauchbarkeit des Verfahrens wurde auch an Zellfraktionen gezeigt.

Summary

Brewer's bottom yeast was found to metabolise 2-deoxygalactose by the Leloir pathway. After adaptation of the yeast to D-galactose, there is an accelerated uptake of the deoxyhexose and a large, intracellular accumulation of deoxyhexose phosphate esters under aerobic conditions. In anaerobiosis, dephosphorylation reactions result in the release of 2-deoxyglucose (derived from 2-deoxygalactose) and its loss into the medium. In non-adapted yeast there is a small amount of phosphorylation, but no demonstrable conversion to 2-deoxyglucose.

These two deoxy sugars are not degraded in the yeast cell, so the resulting 2-deoxyglucose can easily be detected. Thus 2-deoxygalactose serves as a marker in a simple test for the Leloir pathway. The method has also been applied to cell fractions.

Dr. W. Fischer, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 852 Erlangen, Wasserturmstraße 3.

Sonderdruck
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 336, S. 206–218, 1964

Die Umsetzung von 2-Desoxy-D-galaktose im Stoffwechsel, II
Identifizierung der phosphorylierten Zwischenprodukte

Von

Werner Fischer und Gerhard Weidemann

Walter de Gruyter & Co., Berlin

Die Umsetzung von 2-Desoxy-D-galaktose im Stoffwechsel, II[1]

Identifizierung der phosphorylierten Zwischenprodukte

Von

Werner Fischer und **Gerhard Weidemann***

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen/Nürnberg

(Der Schriftleitung zugegangen am 2. August 1963)

Herrn Professor May zum 65. Geburtstag

In der vorausgehenden Arbeit[1] wurde nachgewiesen, daß an D-Galaktose adaptierte untergärige Bierhefe 2-Desoxy-D-galaktose zu 2-Desoxy-D-glucose umzusetzen vermag. Dabei zeigte sich, daß die Desoxyhexosen nicht abgebaut werden; es kommt in den Zellen zu einer beträchtlichen Anreicherung von „2-Desoxy-hexosephosphaten", die sich bei der Papierchromatographie des Zellinhaltes als zwei gut trennbare Fraktionen darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese „Phosphatester" isoliert und als Zwischenprodukte des Leloir-Weges charakterisiert.

Materialien und Methoden

Soweit nicht eigens angegeben, wurden die gleichen Materialien und Methoden wie in der vorausgehenden Arbeit[1] benutzt. Die alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) sowie die bei der Chromatographie als Vergleichssubstanzen verwendeten Mononucleotide wurden von Sigma Chemical Corporation bezogen. Für die Überlassung von gereinigter Hexose-1-phosphat-Uridylyltransferase (UDP-Glucose:α-D-Galaktose-1-phosphat-Uridylyltransferase**, EC 2.7.7.12) aus *Escherichia coli* sind wir Herrn Professor Dr. Kurahashi (Tokyo) zu großem Dank verpflichtet. Polyäthylenimin (Polymin P) wurde uns dankenswerterweise von den Badischen Anilin- & Sodafabriken zur Verfügung gestellt.

Die Identifizierung der Nucleotide erfolgte dünnschichtchromatographisch auf einem Gemisch aus Polyäthylenimin und Cellulose; als Laufmittel wurde wäßr. NaCl-Lösung verwendet[2]. Zum Nachweis von UDP-Hexosen erwies es sich als zweckmäßig, die NaCl-Konzentration auf 0,2*m* zu erniedrigen, da bei den bisher üblichen hohen Konzentrationen diese Verbindungen mit der Front wandern. Für präparative Zwecke verwendeten wir mit Polyäthylenimin imprägniertes Chromatographiepapier[3], wobei wiederum 0,2*m* NaCl als Laufmittel diente.

Ergebnisse

Darstellung der 2-Desoxy-hexosephosphate

Die Phosphatester wurden aus an Galaktose adaptierter Bierhefe gewonnen, die zu diesem Zweck 4 Stdn. in O_2-Atmosphäre mit einer Lösung von 60 mg Des-

* D 29.

** Verwendete Abkürzungen: UMP, UDP, UTP: Uridinmono- bzw. -di- bzw. -triphosphat; A: Adenosin; C: Cytosin; G: Guanosin.

[1] I. Mitteil.: W. Fischer u. G. Weidemann, diese Z. **336**, 195 [1964], vorstehend.

[2] K. Randerath, Dünnschicht-Chromatographie, S. 193, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962.

[3] K. Randerath, Angew. Chem. **74**, 780 [1962].

oxygalaktose in 100 ml 0,05*m* KH_2PO_4 inkubiert worden war. Nach Waschen in 0,05*m* KH_2PO_4 wurden die Zellen durch dreimaliges Ausfrieren in flüssiger Luft geöffnet. Der durch Zentrifugieren gewonnene Überstand wurde sofort neutralisiert und auf dickem, mit Salzsäure gewaschenem Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2071b) durch mehrmaliges Strichauftragen im Start angereichert. Als Fließmittel wählten wir n-Propanol/33proz. Ammoniak/Wasser 6:3:1; es hat den Vorteil, daß im Zellsaft eventuell vorhandene UDP-Hexosen bereits im Start zu UMP und zyklischen Hexosephosphatestern gespalten werden[4] und daher später aus der ähnlich wandernden Fraktion der UDP-2-Desoxy-hexosen nicht abgetrennt zu werden brauchen. Durch absteigende Chromatographie bei 18° und Kammersättigung erreicht man innerhalb von 72 Stdn. eine gute Trennung der beiden hauptsächlichen Desoxyhexosephosphat-Zonen.

Abb. 1 zeigt die Lokalisation der Desoxyhexosephosphate auf dem Chromatogramm. Die beiden Hauptzonen (1 und 2) wurden mit dest. Wasser getrennt aus dem Papier eluiert und die Eluate bei 30° im Vakuum-Rotations-Verdampfer eingeengt. Das Eluat aus Zone 1 wurde zur Entfernung von Nucleotidspuren mit säuregewaschenem Norit A* behandelt; der kohlefrei zentrifugierte Überstand wurde für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet (Frakt. 1).

Abb. 1. Papierchromatogramm (n-Propanol/Ammoniak/Wasser 6:3:1, Durchlaufchromatogramm) des nicht enteiweißten Zellinhaltes aus Hefe nach Inkubation mit 2-Desoxy-galaktose. a) Anfärbung auf 2-Desoxyzucker mit Perchlorsäure (1 und 2 braun gefärbt); b) Anfärbung auf Phosphate mit Molybdat-Reagenz (1 und 2 graublau); c) Nachweis der nucleotidhaltigen Zonen unter der UV-Lampe ($\lambda = 254$ mμ). Bei 3 ist auf dem Originalchromatogramm im durchscheinenden Licht eine deutliche Zone sichtbar, die sich mit Perchlorsäure wie ein 2-Desoxyzucker anfärbt und sich in der Phosphat-Zone durch intensivere Färbung heraushebt.

Im Eluat der langsamer wandernden „Nucleotid-Fraktion" (Zone 2 in Abb. 1) ließen sich dünnschichtchromatographisch auf einer Polymin-P-Cellulose-Schicht[2] neben einem desoxyzuckerhaltigen Nucleotid zwei weitere Nucleotide nachweisen, die frei von 2-Desoxyhexosen waren. Ihre Abtrennung gelang sowohl durch Rechromatographie in n-Propanol/Ammoniak/Wasser 6:3:1 als auch durch Chromatographie

* Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

[4] A. C. Paladini u. L. F. Leloir, Biochem. J. **51**, 426 [1952]; N. S. Gonzalez u. H. G. Pontis, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **69**, 179 [1963].

auf mit Polymin P imprägniertem Papier. Im letzteren Fall verwendeten wir bei der präparativen Darstellung aus dem Papier 0,4*m* NaCl als Elutionsmittel. Zur Abtrennung des Natriumchlorids wurde das Nucleotid des Eluates an Norit A adsorbiert und von diesem mit 50proz. Äthanol eluiert. Das Eluat wurde schließlich im Vakuum-Rotations-Verdampfer bei 30° eingeengt. Das von den Begleitnucleotiden befreite desoxyzuckerhaltige Nucleotid wurde als Frakt. 2 weiter untersucht.

Frakt. 1 erweist sich bei der Rechromatographie in n-Propanol/Ammoniak/Wasser und bei der Hochspannungselektrophorese (800 V, 10 mA, 0°, 90 Min.) in 0,3*m* Borat-Puffer, pH 10, als einheitlich und ist frei von Nucleotiden. Nach dem Dünnschichtchromatogramm (Abb. 3) enthält Frakt. 1 keine freien 2-Desoxyhexosen. Zur weiteren Charakterisierung wurde Frakt. 1 in 0,1*n* H_2SO_4 5 Min. bei 100° unter Verschluß im Wasserbad erhitzt. Das neutralisierte Hydrolysat (Abb. 2. b) wurde zusammen mit nicht hydrolysierter Frakt. 1 gleicher Konzentration (a) bzw. zehnfacher Verdünnung (a′) papierchromatographiert und einmal mit Perchlorsäure auf Desoxyzucker, zum anderen mit Molybdatreagenz auf Phosphate entwickelt. Wie Abb. 2 zeigt, wurden unter den genannten Bedingungen über 90% von Frakt. 1 unter Freisetzung von anorganischem Phosphat hydrolysiert. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der gleichzeitig freigesetzten Zuckerkomponente ergab ausschließlich 2-Desoxy-galaktose (Abb. 3); 2-Desoxy-glucose konnte auch nach mehrfacher Anreicherung des Hydrolysates nicht nachgewiesen werden. Im Start des Dünnschichtchromatogramms bleibt eine Restmenge an nicht gespaltenem Desoxyhexosephosphat zurück, die sich auch in weiteren Versuchen als „säurestabil" erwies und unten als Frakt. 1a näher charakterisiert wird.

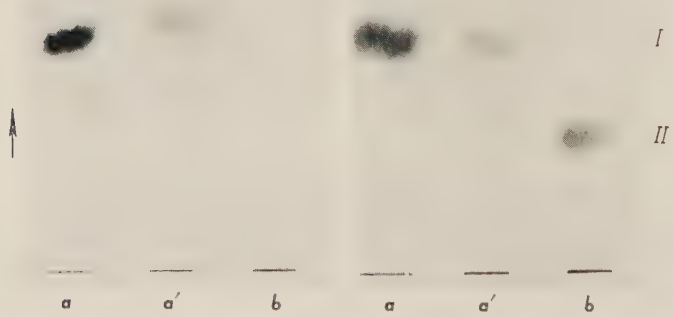


Abb. 2. Säurehydrolyse von Frakt. 1 (0,1*n* H_2SO_4, 100°, 5 Min.). Papierchromatogramm (n-Propanol/Ammoniak/Wasser, Durchlaufchromatogramm), links mit Perchlorsäure, rechts mit Molybdat-Reagenz entwickelt. a und a′ vor der Hydrolyse (a′ 1:10 verdünnt), b nach der Hydrolyse. I: 2-Desoxy-hexosephosphat, II: anorganisches Phosphat.

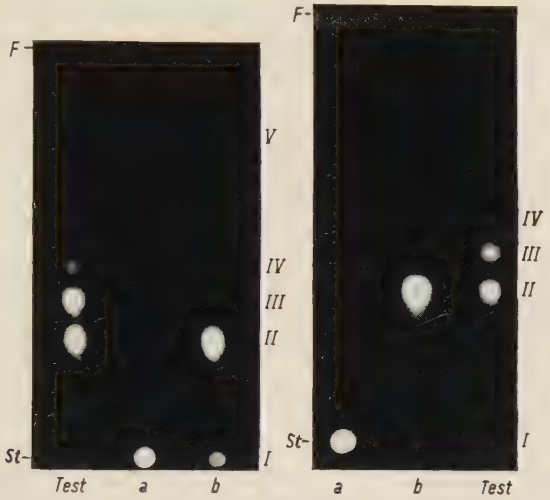


Abb. 3. Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel) des Säurehydrolysats von Frakt. 1. Links: 5 Min. in 0,1*n* H_2SO_4 bei 100°, rechts: 7 Min. in Acetatpuffer, pH 4, bei 100°. a) vor, b) nach Hydrolyse. I: 2-Desoxy-hexosephosphat, II: 2-Desoxy-galaktose, III: 2-Desoxy-glucose, IV: 2-Desoxy-ribose, V: nicht identifiziert (vgl. Text). St = Start, F = Front.

Außerdem tritt eine weitere noch unbekannte Substanz auf (Abb. 3, V), die einen höheren R_F-Wert als 2-Desoxy-galaktose aufweist und mit dem verwendeten Nachweisreagenz auf 2-Desoxyzucker in typischer Weise reagiert. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um ein Kunstprodukt, da eine Substanz mit demselben chromatographischen Verhalten aus reiner 2-Desoxy-galaktose in 0,1*n* H_2SO_4 bereits bei Zimmertemperatur, in verstärktem Ausmaß beim Erhitzen auf 100° auftritt. Diese Verbindung findet sich nicht, wenn 2-Desoxy-galaktose in wäßriger Lösung bei pH 7 oder in Acetatpuffer, pH 4, auf 100° erhitzt wird. Reichstein und Mitarbeiter[5] fanden bei milder Säurehydrolyse (0,1*n* H_2SO_4, 70°, 30 Min.) von 4.6-Benzal-2-desoxy-α-methyl-D-gulosid papierchromatographisch neben der Desoxyhexose gleichfalls eine schneller wandernde Komponente und vermuteten, daß es sich dabei um 1.6-Anhydro-2-desoxy-D-gulose handle, da bei 2-Desoxyhexosen in Analogie zur Glykosidbildung eine relativ große Neigung zur Anhydridbildung zu erwarten sei.

Frakt. 1 besteht demnach zu über 90% aus einem säurelabilen 2-Desoxy-galaktosephosphat. Die Säurelabilität unterscheidet den von uns gefundenen Ester von synthetisch dargestellten 2-Desoxy-D-galaktose-3-phosphat und 2-Desoxy-D-galaktose-6-phosphat, die unter denselben Bedingungen (0,1*n* H_2SO_4, 100°) in 5 Stdn. nur zu 85 und 58% gespalten werden[6]. Säurelabilität und Bildung des Esters in an Galaktose adaptierter Hefe sprechen dafür, daß es sich in Frakt. 1 vorwiegend um 2-Desoxy-D-galaktose-1-phosphat handelt. Dementsprechend gibt

[5] Z. Kowalewski, O. Schindler u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta **43**, 1214 [1960].

[6] A. B. Foster, W. G. Overend u. M. Stacey, J. chem. Soc. [London] **1951**, 987.

Frakt. 1 mit alkalischer 3.5-Dinitro-salicylsäure-Lösung[7] im Tüpfeltest auf Chromatographiepapier nur eine schwache Reduktionsprobe (wahrscheinlich bedingt durch Frakt. 1a), die sich nach Säurehydrolyse um ein Vielfaches verstärkt.

Außerdem wird das in Frakt. 1 enthaltene 2-Desoxy-galaktose-phosphat nach Inkubation mit Hexose-1-phosphat-Uridylyltransferase und UDP-Glucose* in Nucleotidbindung** nachweisbar:

2-Desoxy-galaktose-1-phosphat + UDP-Glucose $\rightleftharpoons$ Glucose-1-phosphat + UDP-2-Desoxy-galaktose.

Da diese Uridylyltransferase selektiv mit α-D-Galaktose-1-phosphat reagiert und β-D-Galaktose-1-phosphat nicht umsetzt[9], dürfte in unserem Falle α-2-Desoxy-galaktose-1-phosphat vorliegen.

In der Literatur finden sich bisher nur Angaben über die Eigenschaften von 2-Desoxy-ribose-1-phosphat, das in Acetatpuffer, pH 4, bei Zimmertemperatur in 20 Min. zu 50% hydrolysiert wird[10]. Bei gleicher Behandlung von Frakt. 1 läßt sich nach 15 Min. dünnschichtchromatographisch noch keine Freisetzung von 2-Desoxy-galaktose nachweisen; nach 30 Min. treten eben faßbare Spuren auf, aber auch nach 60 Min. ist die Spaltung noch recht gering. Erhitzt man jedoch Frakt. 1 mit Acetatpuffer (pH 4 bei Zimmertemperatur) im Wasserbad auf 100°, so wird die Gesamtmenge an 2-Desoxy-galaktose in weniger als 7 Min. in Freiheit gesetzt (Abb. 3). Die größere Labilität von 2-Desoxy-ribose-1-phosphat dürfte darin begründet sein, daß dieser Ester in Furanoseform vorliegt[11], während nach Phosphorylierung von 2-Desoxy-galaktose durch Galaktokinase (EC 2.7.1.6) das stabilere Pyranose-1-phosphat zu erwarten ist.

Die gleiche Säurelabilität wie der Hauptanteil von Frakt. 1 weist auch das 2-Desoxy-hexosephosphat auf, das sich nach Inkubation mit 2-Desoxy-galaktose aus nicht adaptierter Hefe isolieren ließ[1]. Da auch hier die Zuckerkomponente des säurelabilen Esters als 2-Desoxy-galaktose identifiziert werden konnte, wird die Vermutung bestätigt, daß nicht adaptierte Hefe geringe Mengen Galaktokinase besitzt.

---

* Der Ansatz hatte im wesentlichen die Zusammensetzung, wie sie zur Messung der Aktivität der Uridylyltransferase angegeben wird[8]; wir erhöhten die Konzentration an UDP-Glucose (2 μMol/cm³) und setzten etwa äquimolare Mengen an 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat zu. Die Umsetzung des Esters konnte an der — allerdings langsamen — Bildung von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat verfolgt werden, da das frei werdende Glucose-1-phosphat durch gekoppelte Reaktion der im Ansatz vorhandenen Phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) umgesetzt wird.

** Papierchromatographisch mit Frakt. 2 identisch.

[7] A. Jeanes, C. S. Wise u. R. J. Dimler, Analytic. Chem. **23**, 415 [1951].

[8] K. Kurahashi u. A. Sugimura, J. biol. Chemistry **235**, 940 [1960].

[9] W. J. Rutter u. R. G. Hansen, J. biol. Chemistry **202**, 323 [1953].

[10] M. Friedkin u. H. M. Kalckar, J. biol. Chemistry **184**, 437 [1950].

[11] D. L. MacDonald u. H. G. Fletcher jr., J. Amer. chem. Soc. **84**, 1262 [1962].

Frakt. 1a: Da es nicht gelang, das „säurestabile" 2-Desoxy-hexose-phosphat auf chromatographischem Weg aus Frakt. 1 abzutrennen, wurde es unmittelbar aus den mit 2-Desoxy-galaktose inkubierten Hefezellen gewonnen.

Nach dem üblichen Auffrieren der Zellen und Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde der Überstand zur Spaltung von 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat in Acetat-Puffer, pH 4, bei 100° 7 Min. lang erhitzt, neutralisiert und stark eingeengt. Die präparative Papierchromatographie wurde wie zur Gewinnung von Frakt. 1 durchgeführt.

Das mit Norit A behandelte Eluat ist frei von Nucleotiden, anorganischem Phosphat und 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat. Nach Rechromatographie in n-Propanol/Ammoniak/Wasser und bei der Hochspannungselektrophorese (800 V, 10 mA, 0°) in 0,3*m* Borat-Puffer, pH 10, findet sich eine einzige Zone, die gleichermaßen einen positiven Nachweis auf 2-Desoxyzucker und Phosphat gibt. Papierchromatographisch und elektrophoretisch zeigt der Ester die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie authent. 2-Desoxy-D-glucose-6-phosphat.

Wegen ihrer Säurestabilität wurde die Substanz zur Identifizierung der Zuckerkomponente mit alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1) in Acetat-Ammoniak-Puffer, pH 9, 240 Min. lang bei 35° inkubiert. Wie Abb. 4 zeigt, ist der Ester nach dieser Zeit unter ausschließlicher Freisetzung von 2-Desoxy-glucose vollständig gespalten. Der abgespaltene Zuckeranteil wurde außerdem durch Umsetzung mit Glucose-Oxydase identifiziert (vgl. l. c.[1]). Die Stabilität während der 5-Min.-Hydrolyse in 0,1*n* H_2SO_4 bei 100° spricht dafür, daß es sich bei Frakt. 1a um 2-Desoxy-glucose-6-phosphat handelt. Eine Vorstellung über das mengen-

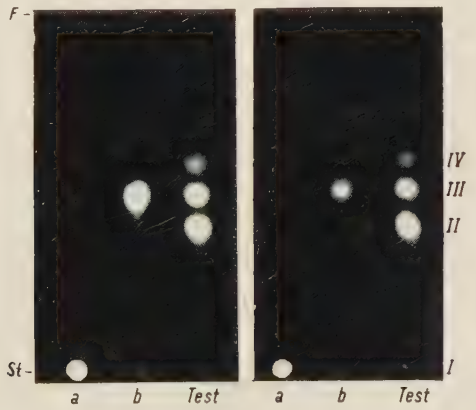


Abb. 4. Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel) zur Identifizierung der Zuckerkomponente von Frakt. 1a mittels alkalischer Phosphatase. Links: Inkubation von authent. 2-Desoxy-glucose-6-phosphat; rechts: Inkubation von Frakt. 1a; a) zu Beginn, b) nach 240 Min. Inkubation. I: 2-Desoxy-hexosephosphat, II: 2-Desoxy-galaktose, III: 2-Desoxy-glucose, IV: 2-Desoxy-ribose. St = Start, F = Front.

mäßige Verhältnis von 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat und 2-Desoxy-glucose-6-phosphat in den Hefezellen vermittelt Abb. 9.

Frakt. 2: Bei der Dünnschichtchromatographie von Frakt. 2 auf einer Polyäthylenimin-Cellulose-Schicht mit 0,2*m* wäßriger NaCl-Lösung erscheint unter der UV-Lampe ($\lambda = 254$ mμ) eine einzige Nucleotid-Zone, welche die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie UDP-Glucose aufweist (vgl. Abb. 7). Frakt. 2 gibt in wäßriger Lösung bei pH 7 und pH 12 das für Uridinnucleotide charakteristische UV-Absorptionsspektrum (Abb. 5). Zur weiteren Charakterisierung wurde in Frakt. 2 die Konzentration an Uridinnucleotid mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten[12] bei pH 7 und einer Wellenlänge von 260 mμ ermittelt, anschließend die Konzentration an 2-Desoxyhexosen mit der Stollschen Probe* bestimmt und ein molares Verhältnis Uridinphosphat:2-Desoxyhexosen von 1:0,8 gefunden.

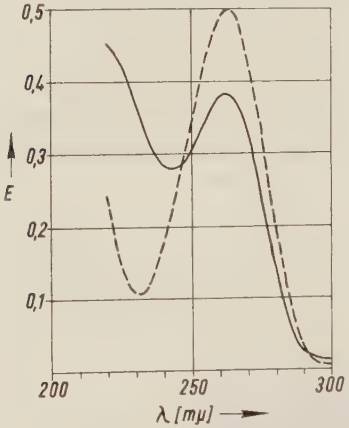


Abb. 5. Absorptionsspektrum von Frakt. 2 im ultravioletten Bereich bei pH 7 (ausgezogen) und pH 12 (gestrichelt). Die Extinktion wurde gegen einen Papierleerwert gemessen, der in derselben Weise wie Frakt. 2 gewonnen wurde.

Gemessen an der Freisetzung der 2-Desoxyhexosen in Acetatpuffer, pH 4, bei Zimmertemperatur, schien die Bindung der 2-Desoxyzucker in Frakt. 2 zunächst ähnlich stabil zu sein wie in 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat. Ein deutlicher Unterschied ergibt sich jedoch, wenn man beide Fraktionen bei pH 7 unter Verschluß im Wasserbad von 100° 7 Min. lang erhitzt**: Während aus dem 1-Phosphat unter diesen Bedingungen keine nachweisbaren Mengen an 2-Desoxy-galaktose abgespalten werden, wird aus dem Nucleotid der größte Teil der 2-Desoxyhexosen in Freiheit gesetzt (Abb. 6). Nach der Hydrolyse läßt sich freie 2-Desoxy-galaktose

* Das desoxyzuckerhaltige Nucleotid wurde ohne vorherige Hydrolyse eingesetzt, da die Reaktion im siedenden Wasserbad in stark saurer Lösung abläuft (vgl. l. c.[1]). Die Messung erfolgte gegen einen der präparativen Nucleotiddarstellung entsprechenden Papierleerwert. UDP beeinflußt das Ergebnis nicht.

** Die Proben wurden vor der Hydrolyse mit Natronlauge auf pH 7 eingestellt. Die Hydrolyse erfolgte in verschlossenen Reagenzgläsern aus Quarz.

[12] R. M. C. Dawson, W. M. Elliot u. K. M. Jones, Data for Biochemical Research, S. 78, Oxford University Press, Oxford 1959.

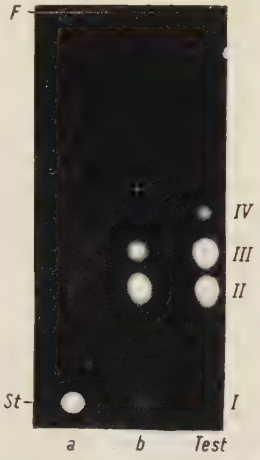


Abb. 6. Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel) zur Hydrolyse von Frakt. 2 (7 Min. bei pH 7 und 100°). a) vor, b) nach Hydrolyse. I: UDP-2-Desoxy-hexosen, II: 2-Desoxy-galaktose, III: 2-Desoxy-glucose, IV: 2-Desoxy-ribose. St = Start, F = Front.

und 2-Desoxy-glucose nachweisen. Bei Dünnschichtchromatographie auf Polymin-P-Cellulose ist nach der Hydrolyse das ursprünglich vorhandene Nucleotid verschwunden (Abb. 7) und ein neues Nucleotid sichtbar geworden, das den gleichen R_F-Wert wie Uridin-5′-diphosphat aufweist (Abb. 8).

Die leichte Spaltbarkeit von Frakt. 2 in Uridindiphosphat und freie Desoxyhexosen berechtigt zur Annahme, daß die Zucker über ihre glykosidische Hydroxylgruppe an den Pyrophosphatanteil des Nucleotides gebunden sind. Frakt. 2 besteht demnach aus einem Gemisch von

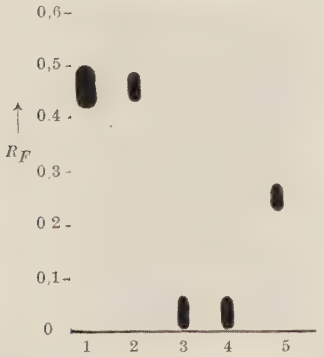


Abb. 7

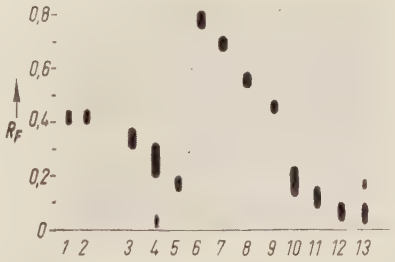


Abb. 8

Abb. 7. Dünnschichtchromatogramm (Polymin-P-Cellulose; 0,2*m* NaCl) zur Identifizierung der Nucleotid-Komponente in Frakt. 2. 1. UDP-Glucose, 2. Frakt. 2, 3. Frakt. 2 nach Hydrolyse (7 Min., 100°, pH 7), 4. UDP, 5. UMP.

Abb. 8. Dünnschicht-Chromatogramm (Polymin-P-Cellulose; 0,6*m* NaCl) zur Identifizierung der Nucleotid-Komponente in Frakt. 2. 1. Frakt. 2 nach Hydrolyse (7 Min., 100°, pH 7), 2. UDP, 3. CDP, 4. ADP, 5. GDP, 6. UMP, 7. CMP, 8. AMP, 9. GMP, 10. UTP, 11. CTP, 12. ATP, 13. GTP.

UDP-2-Desoxy-galaktose und UDP-2-Desoxy-glucose, in dem erstere überwiegt (Abb. 6).

Die von uns aufgefundene UDP-2-Desoxyhexosen unterscheiden sich erwartungsgemäß durch ihre größere Instabilität von UDP-Glucose. die durch 7 Min. langes Erhitzen in wäßriger Lösung bei 100° und pH 7 nicht in chromatographisch faßbarem Ausmaß gespalten wird. Hervorgehoben sei andererseits die Alkalistabilität der UDP-2-Desoxyhexosen, die sich bei der Chromatographie in n-Propanol/Ammoniak/Wasser zeigt, während UDP-Glucose und UDP-Galaktose unter ähnlichen Bedingungen in Uridinmonophosphat und zyklische Hexose-1.2-phosphate gespalten werden[4].

Diskussion

Die drei bisher noch nicht beschriebenen Verbindungen, die nach Inkubation mit 2-Desoxy-galaktose aus galaktoseadaptierten Hefezellen isoliert wurden, können nach den vorläufigen Untersuchungen als 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat, UDP-2-Desoxy-galaktose und UDP-2-Desoxy-glucose angesprochen werden. Die weitere Charakterisierung, insbesondere die Bestimmung der Hydrolysenkonstanten, ist im Gange. Außer diesen drei Verbindungen findet man in den mit 2-Desoxy-galaktose inkubierten Hefezellen 2-Desoxy-glucose-6-phosphat, das als Phosphorylierungsprodukt von 2-Desoxy-glucose aus tierischen Organen[13] und Hefezellen[14] bereits bekannt ist. Mit Ausnahme von 2-Desoxy-glucose-1-phosphat sind damit alle phosphorylierten Zwischenverbindungen erfaßt, die bei der Umwandlung von 2-Desoxy-galaktose in 2-Desoxy-glucose auf dem Leloir-Weg zu erwarten sind:

$$\text{2-Desoxy-galaktose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{2-Desoxy-galaktose-1-phosphat} + \text{ADP} \quad (1)$$

$$\text{2-Desoxy-galaktose-1-phosphat} + \text{UDP-Glucose} \rightleftharpoons \text{Glucose-1-phosphat} + \text{UDP-2-Desoxy-galaktose}^{*} \quad (2a)$$

$$\text{UDP-2-Desoxy-galaktose} \rightleftharpoons \text{UDP-2-Desoxy-glucose} \quad (3)$$

$$\text{2-Desoxy-galaktose-1-phosphat} + \text{UDP-2-Desoxy-glucose} \rightleftharpoons \text{2-Desoxy-glucose-1-phosphat} + \text{UDP-2-Desoxy-galaktose} \quad (2b)$$

$$\text{2-Desoxy-glucose-1-phosphat} \rightleftharpoons \text{2-Desoxy-glucose-6-phosphat} \quad (4)$$

$$\text{2-Desoxy-glucose-6-phosphat} \rightarrow \text{2-Desoxy-glucose} + \text{anorg. Phosphat} \quad (5)$$

$$\text{2-Desoxy-galaktose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{2-Desoxy-glucose} + \text{ADP} + \text{anorgan. Phosphat}$$

* Die Bildung von UDP-2-Desoxy-galaktose könnte anstatt über Reaktion 2a auch durch die in Hefezellen nachweisbare[15] Galaktose-1-phosphat-Uridylyltransferase (EC 2.7.7.10) erfolgen: 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat + UTP $\rightleftharpoons$ UDP-2-Desoxy-galaktose + Pyrophosphat.

[13] D. M. Kipnis u. C. F. Cori, J. biol. Chemistry **234**, 171 [1959].

[14] L. Kiesow, Z. Naturforsch. **14b**, 492 [1959].

[15] H. M. Kalckar, B. Braganca u. A. Munch-Petersen, Nature [London] **172**, 1038 [1953].

Da 2-Desoxy-glucose-6-phosphat nur in geringer Menge auftritt und das Gleichgewicht der Phosphoglucomutase-Reaktion (4) weit auf seiten des 6-Esters liegt, dürfte 2-Desoxy-glucose-1-phosphat, nur in Spuren vorhanden, dem Nachweis entgangen sein. Ein weiteres Desoxyhexose-phosphat, das als Zone 3 in den Chromatogrammen der Abb. 1 erscheint, wurde noch nicht untersucht. Die extrem langsame Wanderungsgeschwindigkeit könnte für 2-Desoxy-glucose-1.6-diphosphat sprechen, das als Zwischenprodukt der Phosphoglucomutase-Reaktion zu fordern ist.

Es fiel uns auf, daß in den Zellen 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat in weit größerer Menge vorhanden ist als 2-Desoxy-glucose-6-phosphat (Abb. 9), obwohl aus energetischen Erwägungen ein Überwiegen des stabileren 6-Phosphates zu erwarten wäre. Der kritische Punkt scheint die Epimerase-Reaktion zu sein, da nach Abb. 6 UDP-Desoxy-galaktose gegenüber UDP-Desoxy-glucose überwiegt, während normalerweise das Gleichgewicht mit 75% auf seiten des Glucosenucleotids liegt[16]. Wir nehmen daher an, daß die in den Zellen vorhandene UDP-Glucose die Epimerisierung von UDP-Desoxy-galaktose verlangsamt und es dadurch zur geschilderten Abweichung vom erwarteten Ablauf kommt.

Abb. 9. Papierchromatogramm (n-Propanol/Ammoniak/Wasser, Durchlaufchromatogramm) zur Charakterisierung der phosphorylierten Zwischenverbindungen: a) Zellinhalt ohne Behandlung, b) nach 7 Min. Hydrolyse bei pH 7 und 100°, c) nach 7 Min. Hydrolyse in Acetatpuffer, pH 4, und 100°. I: freie 2-Desoxyhexosen; IIa und b: 2-Desoxy-galaktose-1-phosphat und 2-Desoxy-glucose-6-phosphat; IIc: 2-Desoxy-glucose-6-phosphat allein; III: UDP-2-Desoxy-hexosen.

Für eine Umsetzung des Desoxyzuckers auf dem Leloir-Weg sprach bereits unsere Beobachtung[1], daß die Umwandlung von 2-Desoxy-galaktose in 2-Desoxy-glucose von der Adaptation der Hefezellen an Galaktose abhängig ist. Die gefundenen Zwischenprodukte bestätigten dies. Nach neueren Arbeiten scheint die Umsetzbarkeit des Desoxyderivates durch die Fermente des Galaktosestoffwechsels nicht auf die Hefezelle beschränkt zu sein. So hemmt z. B. 2-Desoxy-galaktose an Hautschnitten des Menschen die Verbrennung von Galaktose, nicht

[16] L. F. Leloir, Arch. Biochem. Biophysics **33**, 186 [1951].

aber von Glucose[17], was auf ein kompetitives Verhalten des Desoxyzuckers und seiner Phosphorylierungsprodukte an den Leloir-Fermenten hindeutet. Nach Abschluß unserer Untersuchungen veröffentlichte außerdem eine tschechische Arbeitsgruppe eine Kurzmitteilung, nach der bei Verabfolgung von 2-Desoxy-D-galaktose in einer Reihe von Blütenpflanzen freie 2-Desoxy-glucose nachgewiesen werden kann[18].

Die Verabfolgung von 2-Desoxy-galaktose scheint daher zum Nachweis des Leloir-Weges allgemein geeignet zu sein. In Zellen und Geweben, welche ausreichende Aktivität an Glucose-6-phosphatase* besitzen, weist man am einfachsten 2-Desoxy-glucose als Endprodukt der oben formulierten Umsetzungen nach. Allgemeiner brauchbar und aufschlußreicher ist die papierchromatographische Identifizierung der phosphorylierten Zwischenprodukte, die sich, wie in Abb. 9 gezeigt, leicht durch ihre unterschiedliche Labilität orientierend charakterisieren lassen. Die Isolierung und weitere Untersuchung der „Nucleotidfraktion" dürfte eine rasche Entscheidung darüber erlauben, ob die 4-Epimerisierung wie im vorliegenden Fall in Bindung an Uridindiphosphat oder aber am Thymidin- oder Guanosinnucleotid erfolgt (vgl. l. c.[1]). Ein weiteres Anwendungsgebiet für das Phosphat-Chromatogramm liegt in der einfachen Nachweisbarkeit des Fermentdefektes bei galaktosenegativen Mutanten: Ein Ausfall von Galaktokinase oder Uridylyltransferase müßte sich bereits aus dem Übersichtschromatogramm zu erkennen geben, während ein Ausfall der Epimerase am Fehlen von 2-Desoxy-glucose in der „Nucleotid"- und „Monophosphat"-Fraktion nachweisbar wäre. Wir sind dabei, die Brauchbarkeit dieses Verfahrens für den Nachweis der menschlichen Galaktosämie zu erproben.

Die Umsetzung von 2-Desoxy-galaktose gibt einen interessanten Einblick in die Substratspezifität der Leloir-Fermente. Daß die Konfiguration am C-2 des Substratmoleküls keine ausschlaggebende Rolle spielt, war bislang nur für die Galaktokinase bekannt[19]. Unsere Ergebnisse erweitern diese Beobachtung für den gesamten Leloir-Weg und eröffnen damit neue Aspekte für die Um- und Abbaumöglichkeiten von D-Galaktosamin und D-Talose. Besonders interessant wäre die Umsetzung von D-Talose auf dem Leloir-Weg, da von diesem Zucker gezeigt wurde, daß er für das Wachstum von Zellkulturen aus menschlichen Organen genutzt werden kann[20], bisher aber jeder Anhaltspunkt dafür fehlte, auf welchem Weg er in den Stoffwechsel gelangt.

Schließlich sei noch auf die Toxizität der 2-Desoxy-D-galaktose hingewiesen, die sich nach Verabreichung kleiner Mengen im raschen

* EC 3.1.3.9.

[17] S. A. Carney, J. C. Lawrence u. C. R. Ricketts, Biochem. J. **83**, 533 [1962].

[18] J. Kocourek, M. Tichá, V. Jirácek u. J. Kostír, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **71**, 497 [1963].

[19] F. Alvarado, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **41**, 233 [1960].

[20] H. Eagle, S. Barban, M. Levy u. H. O. Schulze, J. biol. Chemistry **233**, 551 [1958].

Tod von Maus[21] und Hühnerembryo[22], im Absterben von Tumorzellen[21], bei Pflanzenwurzeln in einer Wachstumshemmung[23] und bei Hefezellen in herabgesetzter Atmung[24] äußert. Nach den Erfahrungen über die Toxizität von D-Galaktose[25], D-Mannose[26], L-Arabinose[27] und L-Rhamnose[28], die bei Fehlen eines Gliedes in der betreffenden Fermentkette in Erscheinung tritt, scheint für die zugrunde liegende Stoffwechselstörung nicht das freie Monosaccharid, sondern die Anhäufung phosphorylierter Zwischenprodukte verantwortlich zu sein. Es bleibt daher zu prüfen, ob nicht auch die Toxizität der 2-Desoxy-D-galaktose durch die von uns nachgewiesene Anhäufung an Desoxyhexosephosphaten zustande kommt.

Zusammenfassung

Aus an D-Galaktose adaptierter untergäriger Bierhefe wurden nach Verabreichung von 2-Desoxy-galaktose zwei Phosphatester-Fraktionen isoliert: die eine besteht aus 2-Desoxy-D-galaktose-1-phosphat und 2-Desoxy-D-glucose-6-phosphat, die andere aus UDP-2-Desoxy-D-galaktose und UDP-2-Desoxy-D-glucose. Der Nachweis dieser Stoffwechsel-Zwischenverbindungen bestätigt die Umsetzung der 2-Desoxy-D-galaktose auf dem Leloir-Weg.

Die einfache papierchromatographische Darstellungs- und Differenzierungsmöglichkeit dieser in den Zellen angereicherten Phosphatester läßt den Desoxyzucker zum Nachweis des Leloir-Weges als sehr brauchbar erscheinen. Die Anwendungsmöglichkeiten zum Nachweis eventueller Ausfälle innerhalb dieser Fermentkette werden erörtert.

Die gefundene Substratspezifität der Leloir-Fermente bietet auch für den Stoffwechsel von D-Galaktosamin und D-Talose neue Aspekte.

Eine mögliche Beziehung zwischen der intrazellulären Anhäufung der Phosphatester und der bekannten Toxizität der Desoxygalaktose wird diskutiert.

Summary

Brewer's bottom yeast was adapted to D-galactose and then given 2-deoxy-galactose. Two phosphate ester fractions were isolated: 1. 2-deoxy-D-galactose-1-phosphate + 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate; 2. UDP-

[21] J. Laszlo, S. R. Humphreys u. A. Goldin, J. nat. Cancer Inst. **24**, 267 [1960].

[22] W. Fischer u. G. Weidemann, unveröffentlicht.

[23] G. Stenlid, Physiol. Plantarum [Copenhagen] **12**, 310 [1959].

[24] H. de Robichon Szulmajster, V. Internat. Congr. Biochem., Moskau, 1961, Abstr. Commun. S. 381, Nr. 17. 47. 1842.

[25] H. M. Klackar u. H. de Robichon Szulmajster, Bull. Soc. Chim. biol. **61**, 1309 [1959]; M. B. Yarmolinsky, H. Wiesmeyer, H. M. Kalckar u. E. Jordan, Proc. nat. Acad. Sci. USA **45**, 1786 [1959].

[26] A. Sols, E. Cadenas u. F. Alvarado, Science [Washington] **131**, 297 [1960].

[27] E. Englesberg, R. L. Anderson, R. Weinberg, N. Lee, P. Hoffee, G. Huttenhauer u. H. Boyer, J. Bacteriol. **84**, 137 [1962].

[28] E. Englesberg u. L. S. Baron, J. Bacteriol. **78**, 675 [1958].

2-deoxy-D-galactose + UDP-2-deoxy-D-glucose. The identification of these metabolic intermediates confirms the conversion of 2-deoxy-D-galactose by the Leloir pathway.

The ease with which these accumulated phosphate esters may be prepared and differentiated by paper chromatography makes the deoxy-sugars very suitable for the detection of the Leloir pathway. Gaps in this sequence of enzymes may also be detected.

The substrate specificity found for the Leloir enzymes puts a new aspect on the metabolism of D-galactosamine and D-talose.

The intracellular accumulation of phosphate esters and the known toxicity of deoxy-galactose are possibly related.

Dr. W. Fischer, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 852 Erlangen, Wasserturmstraße 3.

Lebenslauf

Am 24. 8. 1937 wurde ich, Gerhard Erwin Herbert Weidemann, als Sohn des Oberingenieurs Erwin Weidemann und seiner Ehefrau Gertrud Weidemann, geb. Piotter, als erstes von zwei Kindern in Berlin-Charlottenburg geboren.

Vom September 1943 bis Februar 1945 besuchte ich während unserer Evakuierung die Volksschule in Bredereiche/Mecklenburg, dann die Volksschule in Berlin-Spandau. Im September 1946 trat ich in die Oberrealschule in Berlin-Spandau ein. Nach der Übersiedlung nach Erlangen besuchte ich dort die Ohm-Oberrealschule, an der ich am 18. 7. 1957 das Reifezeugnis erhielt.

Im Wintersemester 1957/58 begann ich das Medizin-Studium an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen. Hier legte ich im Oktober 1958 das Vorphysikum und im April 1960 das Physikum ab und beendete mit bestandener ärztlicher Prüfung das Studium im Januar 1964.